

Quantitative Immun-Elektrophorese Eine Mikromethode zur Routinebestimmung der Serumproteine

Von W. STEPHAN und U. FRAHM

*Aus der Wissenschaftlichen Abteilung der Biotest-Serum-Institut GmbH Frankfurt/Main
(Leiter: Privatdozent Dr. H. Determann)*

(Eingegangen am 14. April 1970)

Es wird eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Serumproteinen beschrieben, die geringe Mengen Antiserum benötigt, außer den Immunglobulinen alle klinisch bedeutsamen Proteine darstellt und mit dem normalen Immunelektrophoresezubehör auskommt. Die Technik ist bei gut reproduzierbaren Ergebnissen als Routinemethode geeignet. Die klinische Bedeutung wird anhand pathologischer Seren demonstriert.

Quantitative immuno-electrophoresis, a micromethod for the determination of serum proteins

A method is described for the quantitative determination of serum proteins. Small amounts of antiserum are required and the method measures all the clinically important proteins, with the exception of the immunoglobulins. The normal immuno-electrophoresis apparatus is used; the method gives good reproducibility and is suitable for routine use. Important clinical applications are demonstrated with the aid of pathological sera.

Neben der Bestimmung der Immunglobuline (1) spielt die quantitative Erfassung der übrigen Serumproteine in der klinischen Diagnostik eine immer größere Rolle (2). In der Praxis werden hier vor allem die radiale Immundiffusion nach MANCINI (3) und ihre Variationen (4, 5) sowie die Elektroimmundiffusion (6) angewandt.

Ein Nachteil der angeführten Techniken liegt darin, daß nur jeweils ein Protein mit einem spezifischen Antiserum bestimmbar ist und daß sich die Anzahl der prinzipiell erfassbaren Proteine nach der Zahl der erhältlichen spezifischen Antiseren richtet.

Da man aber in der klinischen Diagnostik am Studium der Veränderungen im Gesamtspektrum der Serumproteine interessiert ist, erscheint die quantitative Laurell-Elektrophorese hier die Methode der Wahl.

Mit der zuerst von LAURELL (7), später von CLARKE und FREEMAN (8) beschriebenen Methode gelingt es unter Verwendung von Anti-Humanserum vom Kaninchen in einem 2 Stufen-Verfahren mindestens 30 Serumproteine quantitativ zu bestimmen. Einer breiten Anwendung dieser sehr ergiebigen Technik standen bisher die durch die großen Mengen Antiserum bedingten hohen Kosten entgegen.

Abhilfe schuf hier die Modifikation von FIRESTONE (9). Es wird die Antiserummenge auf etwa 125 μ l pro Analyse reduziert, so daß diese Technik in der Routineanalytik anwendbar ist. Sie erfordert jedoch ein spezielles Elektrophoresezubehör.

Im folgenden wird eine Antiserum-sparende Mikromethode beschrieben, die mit der normalen Routine-Immunelektrophorese-Ausstattung durchführbar ist und unter Verwendung von 0,25 ml Antiserum etwa 25 Fraktionen des menschlichen Serums quantitativ darstellt.

Prinzip

Bei der hier beschriebenen Methode handelt es sich um eine Verkleinerung der von LAURELL entwickelten Technik. Sie beruht bekanntlich auf einer „2 Phasen-Elektrophorese“, d. h. während der 1. Phase erfolgt die elektrophoretische Auftrennung eines Proteingemisches (z. B. Serum). Ist dieser Vorgang abgeschlossen, wird der Agarosestreifen mit Antikörper-haltiger Agarose angegossen. Die Platte wird um 90° gedreht, so daß während des zweiten Elektrophorese-Schrittes die bereits aufgetrennten Proteine in die Antikörper-haltige Agarose wandern und präzipitiert werden. Die Fläche jedes Protein-Peaks ist der Konzentration dieses Proteins im Proteingemisch direkt proportional. Sie ist außerdem abhängig von der Antikörperkonzentration.

Da in der Mikro-Technik statt der 10 × 10 cm großen Glasplatten Dia-Gläser von 5 × 5 cm Größe verwendet werden, kann z. B. die Immunelektrophorese-Kammer „Elphor“ von Bender und Hobein benutzt werden (7 Analysen pro Kammer). Da außerdem die Schichtdicke der Agarose sowie die Konzentration des zu analysierenden Serums verringert wurde, konnte die Antiserummenge von 2 ml auf 0,25 ml reduziert werden. Dennoch ist es möglich, etwa 25 Fraktionen darzustellen: von den Immunglobulinen abgesehen, alle klinisch wichtigen.

Infolge der Verwendung von Normal-Diagläsern als Agarose-Träger sind die Ergebnisse besonders gut dokumentierbar und können direkt projiziert werden, wie es zur Demonstration und Diskussion klinischer Befunde wünschenswert ist.

Ein Präparat in Originalgröße zeigt Abbildung 1.

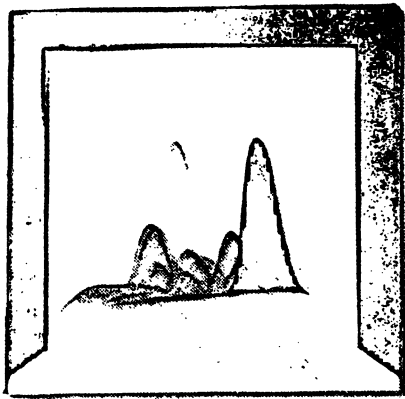


Abb. 1
Gerahmte Mikro-Laurellplatte in Originalgröße
Auftrennung eines Normal-Humanserums

Vergleich der Mikro- mit der Makro-Technik

Ein Vergleich der von uns vorgeschlagenen Laurell-Varianten mit einer typischen Makromethode, z. B. in der Ausführungsform der Fa. Paines & Byrne, Greenford, zeigt wichtige Unterschiede in den experimentellen Daten, die zur besseren Übersicht in Tabelle 1 zusammengefaßt sind.

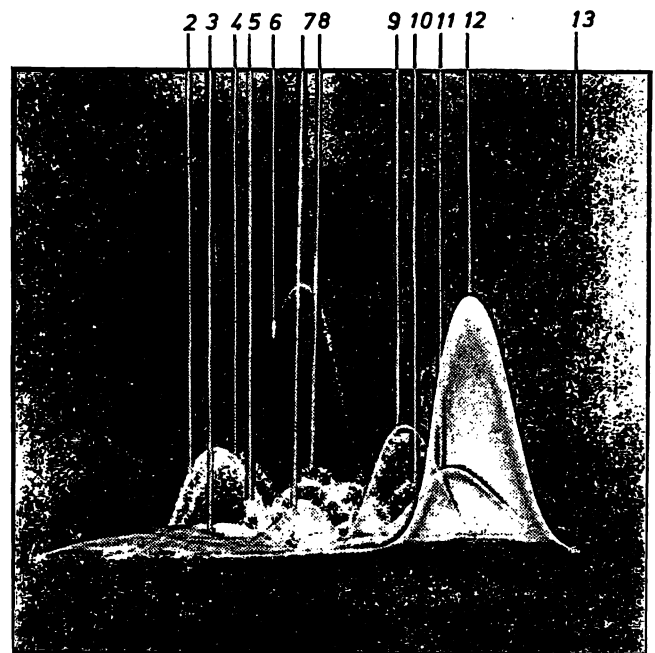
Die Differenzierung der einzelnen Fraktionen zeigt, daß deren Gesamtzahl bei Anwendung der Makrotechnik größer ist als im Falle der Mikromethode (Abb. 2a, 2b). Alle klinisch bedeutsamen Proteine werden jedoch auch von der Mikrotechnik erfaßt wie aus den Abbildungen 2a, b in Verbindung mit Tabelle 2 hervorgeht.

Tab. 1
Vergleich der experimentellen Daten der Mikro- und Makrotechnik

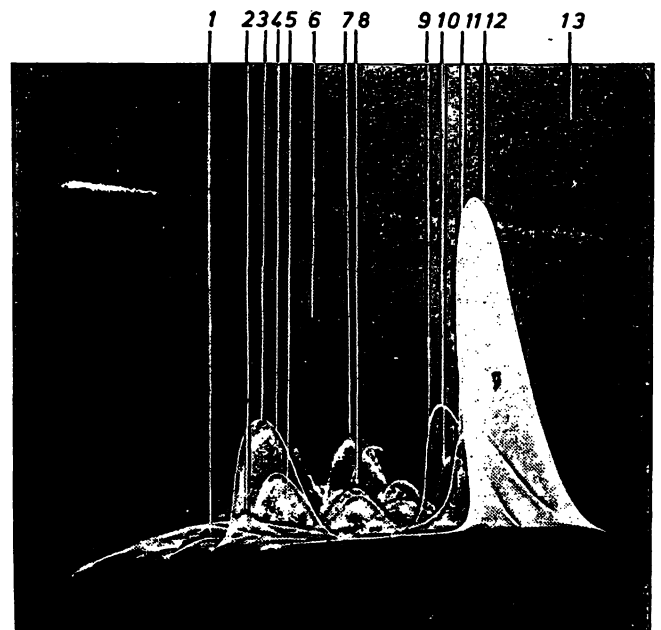
Kenngrößen	Technik	
	Mikro	Makro
Menge Antiserum ml	0,25	2,00
Anzahl der auswertbaren Fraktionen	etwa 25	etwa 35
Proteingehalt der Serumprobe (g/100 ml)	1,25	5,00
Abmessungen der Glasplatten (cm)	5 × 5	10 × 10
Schichtdicke der Agarose (cm)	0,16	0,22
Elektrophorese-Gerät	z. B. Normal-Immun-elektrophoresekammer „Elphor“ von Bender & Hobein	z. B. Spezialkammer mit Thermostat von Paines & Byrne
Elektrophorese-Bedingungen der 1. Phase	1,5—2 Stdn. (300 Volt)	4 Stdn. (200 Volt)
Elektrophorese-Bedingungen der 2. Phase	18 Stdn. (200 Volt)	24 Stdn. (100 Volt)

Tab. 2
Identifizierung der Laurell-Elektrophoretischen Peaks der Abb. 2a + b

Nr.	Serumprotein
1	β_1 C-Globulin
2	β -Lipoprotein
3	Transferrin
4	Haemopexin
5	β_1 A-Globulin
6	Haptoglobin
7	α_2 -Makroglobulin
8	Coeruloplasmin
9	α_1 -Antitrypsin
10	saures α_1 -Glycoprotein
11	α_1 -Lipoprotein
12	Albumin
13	Präalbumin



a) Mikromethode



b) Makromethode

Abb. 2
Laurell-Elektrophoretische Auftrennung eines Normal-Humanserums

Einfluß des Antiserum

Die Höhe eines „Laurell-Peaks“ hängt bekanntlich neben der Antigenkonzentration auch von der Konzentration des korrespondierenden Antikörpers ab:

Aus diesem Grund sind die Laurell-Elektrophoretischen Bilder bei Verwendung der Antiseren verschiedener Hersteller bzw. Produktionschargen außerordentlich unterschiedlich (Abb. 3a u. b).

Neben dem höheren Antikörpertiter gegen zahlreiche Proteine im Falle von Antiserum I fällt bei Antiserum II die überraschend gute Darstellung von Ig G und Ig A auf, die eine quantitative Bestimmung möglich erscheinen läßt.

Wichtig ist, daß man bei Verwendung eines der zahlreich angebotenen Antiseren prüft, bei welchem Verhältnis von Antiserummenge zu Konzentration der Serumprobe das optimale Bild eines Normalserums erhalten wird:

Dies ist dann der Fall, wenn deutliche Abweichungen von der Norm z. B. bei einem pathologischen Serum sowohl nach oben als auch nach unten möglichst in einer Analyse sicher erfaßt werden.

Auswertung

Prinzipiell ergeben sich drei Möglichkeiten für die Auswertung der Laurell-Elektrophorese.

a) Die aufwendigste, jedoch auch die genaueste Art ist das Wiegen der Flächen unter den einzelnen Peaks. Hierzu vergrößert man das Original durch Projektion, zeichnet die interessierenden Flächen mit Bleistift nach, wobei man zweckmäßig eine gemeinsame Grundlinie benutzt; z. B. die Verbindung der Fußpunkte von Albumin und Transferrin. Da sich viele Fraktionen überlagern, empfiehlt es sich, die Zeichnung zu fotokopieren. Die Gewichte der ausgeschnittenen Flächen vergleicht man mit denen eines Standardserums und erhält als Ergebnis die prozentuale Abweichung von der Norm, oder unter Verwendung der von SCHULTZE und HEREMANS (10) angegebenen Normalwerte auch Angaben in mg/100 ml.

b) Ist das oben erwähnte Verfahren zu zeitraubend, empfiehlt es sich zu planimetrieren. Die Bestimmung der Flächen kann auch durch Berechnung nach der Formel $F = h \cdot \frac{1}{2} b$ erfolgen (9). Hierbei werden brauchbare Resultate jedoch nur bei symmetrisch geformten Peaks erhalten.

c) Eine besonders einfache und schnelle Auswertung besteht im Messen der Höhen der Peaks.

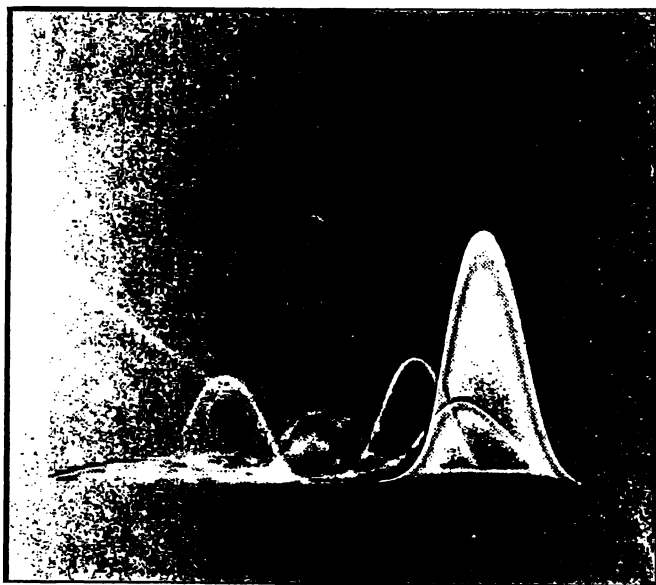
In einer 10fachen-Bestimmung wurde die aufwendigste Auswertung (durch Wägung) und die einfachste (Messung der Höhen) an 11 charakteristischen Proteinen auf Reproduzierbarkeit geprüft und der Variationskoeffizient (VK) ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Aus Tabelle 3 entnimmt man, daß die Wägemethode bei einem Variationskoeffizienten von durchschnittlich 5 sehr gut reproduzierbare Ergebnisse liefert, lediglich die leicht denaturierbaren Lipoproteine fallen hier etwas heraus. Die Messung der Höhe der Peaks zeigt eine nur geringfügig schlechtere Reproduzierbarkeit: Bei der wesentlich einfacheren Durchführung ist für viele Fragestellungen diese Auswertungsart jedoch völlig ausreichend.

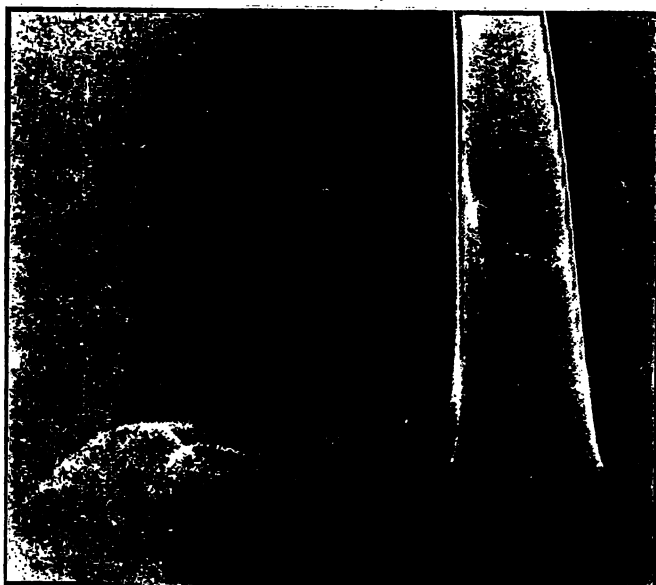
Tab. 3

Zusammenstellung der Variationskoeffizienten in Abhängigkeit von Serumprotein und Auswertmethode

Nr.	Serumprotein	Auswertverfahren	
		Wiegen	Messen der Höhe
2	β -Lipoprotein	16,8	8,9
3	Transferrin	6,8	9,6
4	Haemopexin	7,5	12,1
5	β_2 A-Globulin	7,2	6,5
6	Haptoglobin	5,6	7,6
7	α_2 -Makroglobulin	5,1	5,3
8	Coeruloplasmin	7,0	6,6
9	α_1 -Antitrypsin	3,7	6,0
10	saures α_1 -Glycoprotein	4,3	5,4
11	α_1 -Lipoprotein	10,0	10,9
12	Albumin	3,2	6,5



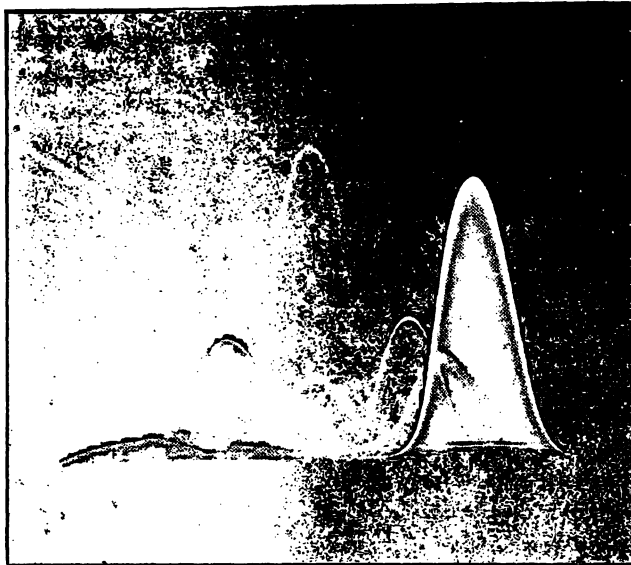
a) Handelspräparat I



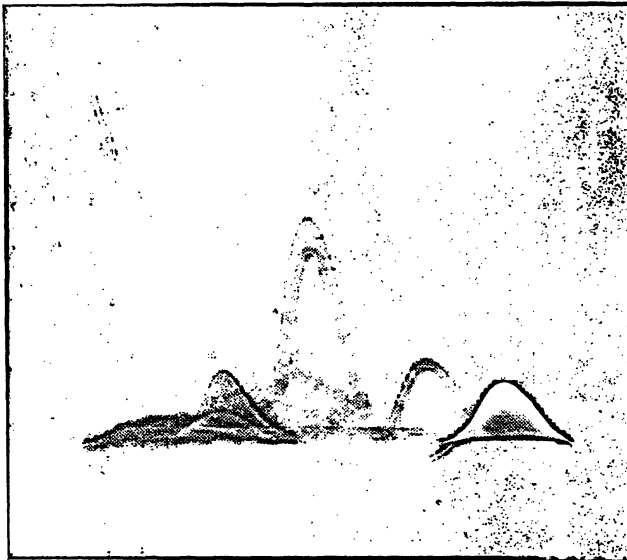
b) Handelspräparat II

Abb. 3

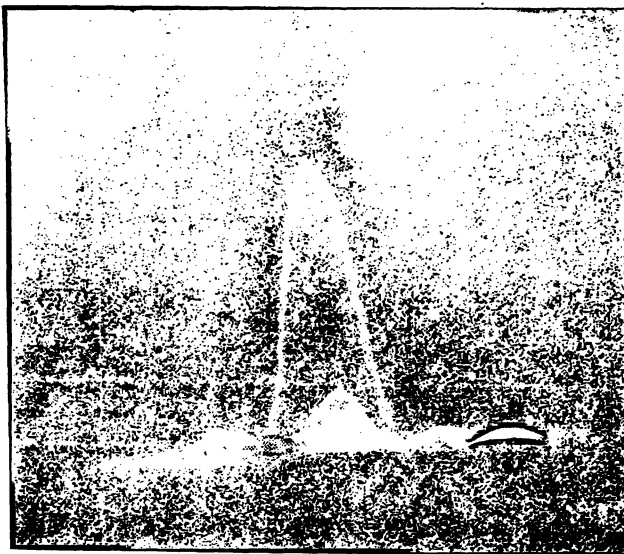
Laurell-Elektrophoretische Auftrennung eines Normal-Humanserums, Darstellung mit Anti-Humanserum vom Kaninchen



a) Standard (Serumverdünnung 1 + 5)



b) Nephrose-Serum (Serumverdünnung 1 + 5)



c) Nephrose-Serum (Serumverdünnung 1 + 20)

Abb. 4 a—d
Laurell-Elektrophoretische Auftrennung der pathologischen Seren
aus Tab. 5 und des Standard-Serums

Vergleich verschiedener Modifikationen der Laurell-Technik

Es interessiert die Frage, in wie weit die hier beschriebene Methode in ihrer Reproduzierbarkeit mit denen von anderen Autoren angegebenen Verfahren vergleichbar ist. Während FIRESTONE (9) ebenfalls eine Antiserumsparende Modifikation benutzt, gewannen CLARKE und FREEMAN (8) ihre Befunde mit der „klassischen“ Laurell-Elektrophorese. Die Ergebnisse dieses Vergleichs (Bestimmung des Variationskoeffizienten VK) sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tab. 4

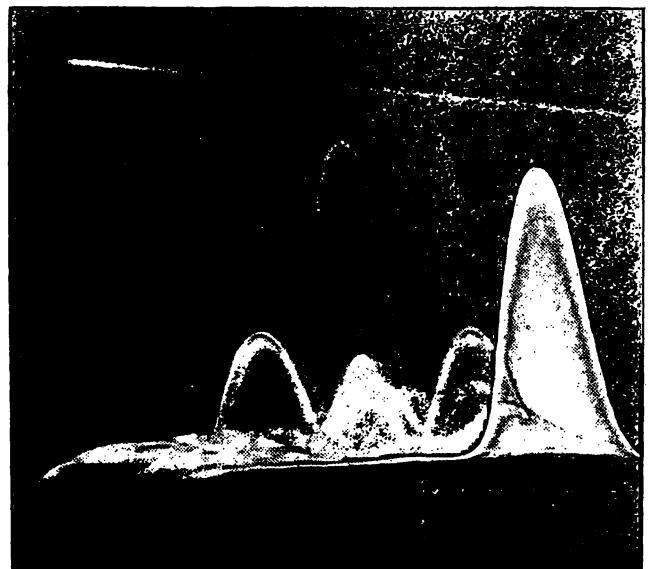
Vergleich der Reproduzierbarkeit verschiedener Laurell-Techniken

Serumprotein	Mikro STEPHAN	Mikro FIRESTONE	Makro CLARKE und FREEMAN
β -Lipoprotein	16,8	—	21
Transferrin	6,8	4,3	9
Haemopexin	7,5	—	8
β_1 A-Globulin	7,2	6,1	17
Haptoglobin	5,6	4,1	8
α_2 -Makroglobulin	5,1	—	7
Coeruloplasmin	7,0	—	7
α_1 -Antitrypsin	3,7	—	—
saures α_1 -Glycoprotein	4,3	—	—
α_1 -Lipoprotein	10,0	6,6	8
Albumin	3,2	—	—

Der Vergleich zeigt, daß die drei Methoden in ihrer Reproduzierbarkeit vergleichbar sind. Das etwas bessere Abschneiden der Varianten nach FIRESTONE liegt sicher auch in der geringeren Anzahl der in dieser Zusammenstellung geprüften Proteine begründet.

Untersuchung pathologischer Seren

Nachdem bisher die methodischen Grundlagen beschrieben wurden, soll zum Schluß die klinisch-diagnostische Bedeutung anhand von zwei pathologischen Seren demonstriert werden. Bei den geprüften Seren handelt es sich einmal um eine chronisch-aggressive Hepatitis, zum anderen um eine kindliche Lipoid-Nephrose. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Die Laurell-Elektrophoretischen Aufnahmen zeigen die Abbildung 4a, b, c, d.



d) Chronische Hepatitis (Serumverdünnung 1 + 5)

Aus Tabelle 5 entnimmt man, daß im Falle der Nephrose das Serum an allen Proteinen verarmt ist, deren Molekulargewicht (M) kleiner ist als 100 000. So z. B. α_1 -

Tab. 5

Laurell-Elektrophoretische Untersuchung pathologischer Seren
(Angaben in Prozent der Norm)

Nr.	Serumprotein	chron. Hepatitis		kindl. Lipoid-Nephrose	
		Gewichte (% der Norm)	Höhen (% der Norm)	Gewichte (% der Norm)	Höhen (% der Norm)
2	β -Lipoprotein	90,5	95,5	323,0	260,0
3	Transferrin	90,5	88,0	26,3	27,3
4	Haemopexin	90,5	94,5	47,2	42,8
5	β_2 A-Globulin	89,7	98,0	266,0	200,0
6	Haptoglobin	74,0	82,2	437,0	455,0
7	α_2 -Makroglobulin	141,0	163,0	396,0	354,0
8	Coeruloplasmin	105,0	100,0	—	—
9	α_1 -Antitrypsin	89,0	89,0	56,4	58,0
10	saures α_1 -Glycoprotein	84,2	86,6	56,3	60,0
11	α_1 -Lipoprotein	51,6	46,0	67,0	40,5
12	Albumin	80,0	79,5	17,4	20,4
13	Präalbumin	—	57,4	—	26,8

Antitrypsin ($M = 45\,000$), Präalbumin ($M = 61\,000$), Albumin ($M = 69\,000$) u. a.

Die hochmolekularen Proteine, z. B. α_2 -Makroglobulin ($M = 820\,000$), β -Lipoprotein ($M > 10^6$) u. a. sind dagegen angereichert. Besonders auffallend ist der Befund, daß Haptoglobin mit am stärksten angereichert ist, obwohl sein Molekulargewicht mit $M = 100\,000$ nur geringfügig höher ist als das Molekulargewicht des stark verminderten Transferrins ($M = 90\,000$).

Im übrigen sei nochmals auf die gute Brauchbarkeit der relativ einfachen Bestimmungsmethode durch „Höhenmessung“ hingewiesen.

Fehlerquellen

Neben den zahlreichen Fehlerquellen, auf die besonders CLARKE und FREEMAN (8) ausführlich hingewiesen haben, tritt bei der Untersuchung extrem veränderter, pathologischer Seren oft noch eine zusätzliche Schwierigkeit auf. Es kommt vor, daß einige Peaks nicht nur in ihrer Größe vom Standard abweichen, sondern auch eine veränderte elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit haben. So kann ihre Identifizierung und Zuordnung schwierig werden. In diesem Fall ist eine Orientierung z. B. mit der von uns beschriebenen „Streifen-Technik“ (11) möglich.

Beschreibung der Versuche

Reagenzien und Apparate

Zur Herstellung des Agarosegels diente 0,075M Barbituratpuffer pH 8,6 folgender Zusammensetzung:

Natrium-Barbiturat: 77,0 g Calciumlactat: 3,85 g
Barbitursäure : 13,8 g Natriumazid : 1,00 g
ad 5 l mit dest. Wasser.

Für die Elektrophorese wird der Puffer auf 0,0375M verdünnt. Als Antiserum wurde im allgemeinen das Präparat der Behringwerke (Marburg) verwendet, die auch die Agarose lieferten. Zur Markierung des Albumins wurde eine Lösung aus 0,2 g Bromphenolblau in 100 ml Barbituratpuffer 0,0375M benutzt. Filterpapier (2043b Mgl.) wurde von Schleicher & Schüll (München) bezogen.

Die elektrophoretische Auftrennung wurde in der „Elphor“-Kammer für Immunelektrophorese der Fa. Dr. Bender und Dr. Hobein (München) durchgeführt.

Als Agaroträger dienten Diapositiv-Gläser (5×5 cm).

Zum Auftragen der Serumproben wurde eine Terumo-Mikrospritze (UMS 10) der Fa. Shandon (Frankfurt) und zum Stanzen der Auftragsbrunnen ein Well Cutter (LKB 6818 A: $\varnothing 1,5$ mm) der Fa. Gelman benutzt.

Aufgetrennt wurden je $1,5 \mu\text{l}$ Humanserum in der Verdünnung $1 + 5$ (etwa 1,25% Protein). Als Standard diente ein Mischserum von 30 gesunden männlichen Blutspendern.

Arbeitsgang

Vorbereitung der Dia-Gläser

Die Dia-Gläser werden mit einer heißen Reinigungslösung, z. B. RBS 25 oder Extran sorgfältig fettfrei gewaschen. Sie werden gründlich mit heißem Leitungswasser, entsalztem Wasser und vergälltem Äthanol gespült und anschließend auf Filterpapier im Wärmeschrank bei 60° getrocknet. Die Kanten der Platten werden dann mit 1proz. wäbr. Agaroselösung mittels eines schmalen Pinsels bestrichen und etwa 30 Min. bei 60° getrocknet. Dieser Vorstrich erfolgt, um das Agarosegel fester anzuheften: Ein Ablösen der Gelschicht während der Aufarbeitung wird so verhindert.

Bereitung der Platten für den 1. Elektrophorese-Schritt

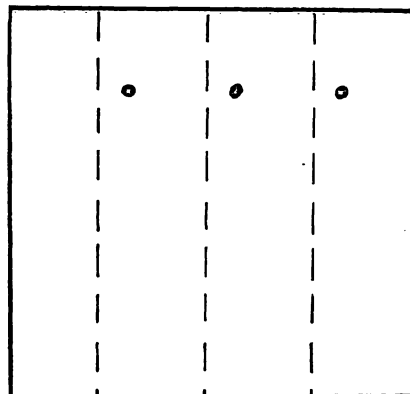
Sieben 5 ml Glasfläschchen werden mit jeweils 2 ml Puffer in einem Wasserbad auf 50° erwärmt. In einem siedenden Wasserbad wird 1,0 g Agarose zu einem 2proz. wäbr. Gel gelöst und zur Konservierung 0,1% Natriumazid hinzugefügt. Die Agaroselösung wird auf 50° temperiert. Anschließend gibt man in jedes Pufferfläschchen 2 ml Agaroselösung und durchmischt. Den Inhalt eines Fläschchens gießt man auf ein an den Kanten vorgestrichenes Dia-Glas, das absolut waagrecht liegen muß (Nivelliertisch). Nach dem Erstarren werden die Platten in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Das restliche Agarosegel verbleibt bis zur Herstellung der Antikörper-Agarose im Wasserbad.

Bereitung der Antikörper-haltigen Agarose

Sieben 5 ml Fläschchen mit je 1,4 ml Puffer und 0,25 ml Anti-Humanserum vom Kaninchen werden einige Minuten im Wasserbad auf 50° angewärmt, bevor 1,4 ml der obigen 2proz. Agaroselösung hinzupipettiert werden. Nach vorsichtigem Mischen ist die Lösung für den Anguß gebrauchsfertig. Es ist ratsam, diese Mischung nicht länger als 30 Min. im Wasserbad aufzubewahren.

Erste Phase der Elektrophorese

Auf einer wie oben gegossenen Platte werden mit einem Lochmesser von Hand nach einer Vorlage (Skizze 1) drei Löcher vorgestanzt und mit einer Wasserstrahlpumpe ausgehoben.



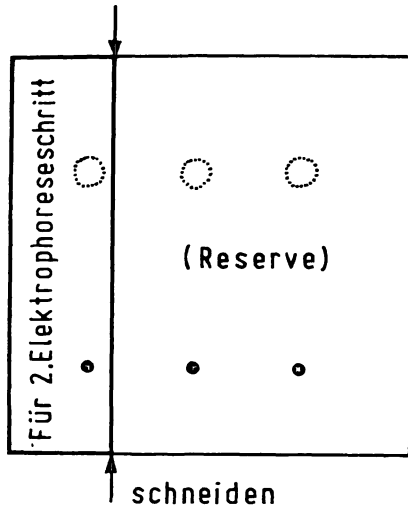
Skizze 1

Die zu untersuchenden Serumproben werden $1 + 5$ mit physiologischer NaCl-Lösung auf einen Proteinwert von etwa 1,25% verdünnt. Neun Teile dieser Serumverdünnung werden mit einem Teil einer 0,2proz. Bromphenolblaulösung versetzt, um das Albumin zu markieren. Von dieser Mischung werden pro Loch $1,5 \mu\text{l}$ mit einer Mikrospritze aufgetragen.

Nach Entfernen der Objektträgerbänke werden die Platten direkt auf den Verbindungsblock der Immunelektrophoresekammer „Elphor“ gelegt und durch Filterpapier mit dem Puffer verbunden. Die elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches erfolgt während 1,5–2 Stdn. bei 300 Volt. In dieser Zeit legt das Albumin, durch Bromphenolblau markiert, eine Strecke von etwa 2,5 cm zurück.

Zweite Phase der Elektrophorese

Nach abgeschlossener erster Elektrophorese werden die Platten bis zur weiteren Verwendung in eine feuchte Kammer gelegt. Mit einem Küchenmesser schneidet man, wie in Skizze 2 angegeben,



Skizze 2

soviel Agarosegel ab, daß eine „Serumauftrennung“ übrig bleibt. Danach wird mit Antikörper-haltiger Agarose angegossen. Die restliche Agaroseschicht mit den beiden übrigen Auftrennungen des gleichen Serums wird auf ein neues Dia-Glas gelegt und als Reserve in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Sollte der Anguß der Antikörper-haltigen Agarose einmal mißlingen, so kann die Analyse durch Überbringen eines „Reservestreifens“ auf eine zweite Glasplatte und erneutem Anguß mit Antikörper-haltigem Agarosegel fortgesetzt werden.

Nach dem Erstarren werden die Platten um 90° im Uhrzeigersinn gedreht, in die Elektrophoresekammer gelegt und durch Filterpapier mit dem Puffer verbunden. Vor dem zweiten Elektrophoreseschritt wird zweckmäßig umgepolt.

Die zweite Elektrophorese-Phase dauert etwa 18 Stdn. (über Nacht) bei 200 Volt.

Aufarbeitung und Färbung

Nach beendeter Elektrophorese werden die Platten für etwa 48 Stdn. in 0,9proz. NaCl + 0,1proz. Na-azid proteinfrei gewaschen. Anschließend werden sie durch Abdecken mit feuchtem Filterpapier (5 × 5 cm) unter einer Glühbirne getrocknet. Für 5 Min. fixiert man in 2proz. Essigsäure, färbt 10 Min. in 0,5proz. Amidoschwarz 10 B und entfärbt in Methanol-Eisessig (9 + 1).

Rahmung und Auswertung

Die gefärbten Präparate werden mit einem zweiten Dia-Glas bedeckt und wie üblich durch Umkleben mit Papierstreifen gerahmt und beschriftet.

Mit einem einfachen Fotovergrößerungsapparat, bzw. Dia-Projektor werden die Originalplatten vergrößert. Die Auswertung geschieht nach einem der beschriebenen Verfahren, wobei man zweckmäßig eine gemeinsame Basislinie wählt, z. B. eine Verbindung der Fußpunkte von Albumin und Transferrin.

Literatur

1. LoGRIPPO, G. A., G. MANSON und N. SHARPLESS, Henry Ford Hosp. Med. J. 15, No. 3 (1967). — 2. BECKER, W., W. RAPP, H. G. SCHWICK und STÖRIKO, K., diese Z., 6. Jahrg. 1968, H. 3. — 3. MANCINI, G., J. P. VAERMAN, A. O. CARBONARA und J. F. HEREMANS, Immunochemistry 2, 235 (1965). — 4. GOLDBERGER, S., V. LOPEZ und H. KELLER, diese Z. 7, 448 (1969). — 5. VAERMAN, J. P., A.-M. LEBACQ-VERHEYDEN, L. SCOLARI und J. F. HEREMANS, Immunochemistry 6, 279 (1969). — 6. MERILL, D., F. TH. HARTLEY und H. N. CLAMAN, J. Laborat. Clin. Med., S. Louis, 151 (1967). — 7. LAURELL, C.-B., Analyt. Biochem. 10, 358 (1965). — 8. CLARKE, H. G. M. und T. FREEMAN, Clin. Sc., London 35, 403 (1968). — 9. FIRESTONE, H. J. und S. B. ARONSON, Amer. J. Clin. Path. 52, 615 (1969). — 10. In Molecular Biology of Human Proteins, Vol. 1 by Schultze and Heremans, Elsevier-Publishing Co., Amsterdam, London, New York (1960). — 11. STEPHAN, W. und U. FRAHM, diese Z., 8, 391 (1970).

BIOTEST-Serum-Institut GmbH
Dr. W. Stephan
6 Frankfurt (Main)
Flughafenstr. 4